

Synthesen in der Lumiflavin-Reihe

Verkürzte Fassung der INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

PETER HEMMERICH
aus Frankfurt am Main

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1957



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548804_0057

Synthesen in der Lumiflavin-Reihe

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde, vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

PETER HEMMERICH

aus Frankfurt am Main



Basel

Buchdruckerei Birkhäuser AG.

1957

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *H. Erlenmeyer* und Dr. *T. Reichstein*.

Basel, den 5. März 1957.

Prof. Dr. *W. Becker*
Dekan.

Herrn *Peter Hemmerich* wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 5. März 1957 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 5. März 1957 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

„Synthesen in der Lumiflavin-Reihe“

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im anorganisch-chemischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

Synthesen in der Lumiflavinreihe.

Von den Naturstoffen, die Strukturen aufweisen, von denen die Fähigkeit zur komplexen Bindung von Metallionen bekannt ist, ist das Riboflavin, das die für das Oxin charakteristische Chelatgruppe besitzt, von besonderem Interesse^{1) 2)}. Es darf nach *H. R. Mahler* et al.³⁾ vermutet werden, dass beim Riboflavin die biologische Wirkung in Flavoproteinen mit der Ausbildung eines solchen Metall-Komplexes verbunden ist, indem hierbei Systeme mit spezifischem Redox-Potential entstehen.

Von den bisher bekanntgewordenen, die Wirkung des Riboflavins auf das Wachstum von Mikroorganismen⁴⁾ und Zellgewebe⁵⁾ hemmenden Verbindungen sei neben dem Lumiflavin⁶⁾ das von *Woolley*⁷⁾ synthetisierte 7,8-Dimethyl-10-ribityl-2,4-diaminophenazin erwähnt.

Lumiflavin (6,7,9-Trimethylisoalloxazin) (XII) entsteht beim photolytischen Abbau des Riboflavins⁸⁾. Seine Löslichkeitseigenschaften unterscheiden sich nur relativ wenig von denen des Riboflavins.

Im folgenden berichten wir über Synthesen von Verbindungen, die als Strukturanaloge des Lumiflavins und damit des Isoalloxazin-Systems im Riboflavin aufgefasst werden können, wobei darauf geachtet wurde, dass diese Verbindungen in den folgenden Eigenschaften mit der heterozyklischen Komponente im Riboflavin übereinstimmen: Eine dem Isoalloxazin verwandte Mesomerie, intaktes Redoxsystem, intakte Chelatgruppe, ähnliche Molekeldimension, ähnliche Löslichkeitsverhältnisse.

Für Flavinsynthesen sind drei Wege bekannt: Kondensation von primär-sekundären aromatischen o-Diaminen mit Alloxan unter Borsäurezusatz⁹⁾ oder mit 5-Halogenbarbitursäuren in Pyridin¹⁰⁾,

¹⁾ *A. A. Albert*, *Biochem. J.* **54**, 646 (1953); *H. R. Mahler & D. E. Green*, *Science* **120**, 7 (1954); *W. O. Foye & W. E. Lange*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 2199 (1954).

²⁾ *J. R. Merkel & W. J. Nickerson*, *Biochem. biophys. Acta* **14**, 303 (1954).

³⁾ *H. R. Mahler, A. S. Fairhurst & B. Mackler*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1514 (1955).

⁴⁾ Zusammenstellung der in diesem Zusammenhang wichtigen mikrobiologisch wirksamen Verbindungen: *F. Weygand, R. Löwenfeld & E. F. Möller*, *Chem. Ber.* **84**, 101 (1951).

⁵⁾ Vgl. das karzinostatisch wirksame 6,7-Dichlor-9(1'-d-sorbityl)-isoalloxazin von *W. Holly, E. W. Peel, R. Mazingo & K. Folkers*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 5416 (1950).

⁶⁾ *H. P. Sarett*, *J. biol. Chemistry* **162**, 87 (1946).

⁷⁾ *D. W. Woolley*, *J. biol. Chemistry* **154**, 31 (1944).

⁸⁾ *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **279**, 186 (1935).

⁹⁾ *R. Kuhn & F. Weygand*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **68**, 1282 (1935).

¹⁰⁾ *M. Tishler, J. W. Wellmann & K. Ladenburg*, *J. Amer. chem. Soc.* **67**, 2165 (1945).

sowie Kondensation von aromatischen o-sek.-Amino-azokörpern mit Barbitursäure (*Tishler-Kondensation*)¹¹⁾. Nur die beiden letztgenannten Methoden erlauben Variation der Pyrimidin-Komponente. Als Amino-azokörper verwendeten wir das N,3,4-Trimethyl-6-(p-carboxyphenylazo)-anilin (IX), zu dessen Gewinnung wir von 3,4-Dimethylanilin (I)¹²⁾ ausgingen, dessen N-Monomethylierung zu V über das Tosylderivat II mit einer Ausbeute von 83,5% gelang. Die Methylierung von II muss durch mehrmalige Behandlung mit überschüssigem Dimethylsulfat in alkalischem Milieu ausgeführt werden, da sonst Verunreinigungen durch mitgefälltes Na-Salz von II auftreten, so dass nach der Verseifung kein reines sekundäres Amin V erhalten wird. Die Verseifung des Tosylates III lässt sich nicht wie üblich in 70-proz. H₂SO₄ ausführen, da hierbei zu ca. 40% Umlagerung zu IV eintritt. Hingegen verläuft die Reaktion in konz. HCl fast quantitativ. Das so gewonnene N,3,4-Trimethylanilin enthält keine Spuren primärer oder tertiärer Base.

Bei der folgenden Kupplung zum Aminoazokörper IX steht die Wahl der aktiven Komponente frei, da diese in der nächsten Stufe wieder abgespalten wird. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass neben dem gewünschten 6-Azo-Derivat auch das N-Substitutionsprodukt und das 2-Azo-Derivat entstehen, so dass eine Reinigung notwendig ist. Die mit diazotiertem Anilin bei dieser Reaktion entstehenden Farbstoff-Gemische liessen sich nicht trennen. Die mit p-Nitranilin gebildeten drei Isomeren VI, VII und VIII konnten wir chromatographisch rein erhalten, aber in zu geringer Ausbeute. Als geeignet erwies sich schliesslich p-Aminobenzoesäure. Die entstehenden p-Carboxyphenylazokörper zeichnen sich durch gutes Kristallisationsvermögen der freien Säuren in org. Lösungsmitteln wie auch der Ammonium-Salze in Wasser und durch gute Unterscheidbarkeit zwischen Aminoazo- (IX) und Diazoamino-Isomeren (X) aus: Die hellorange gelbe Verbindung X wird beim Schmelzen decarboxyliert und ist in allen organischen Mitteln nur wenig löslich, beides im Unterschied zum karminroten Farbstoff IX. X lässt sich mit *Raney-Nickel* in Alkohol bei Zimmertemperatur unter Atmosphärendruck nicht hydrieren¹³⁾, IX hingegen liefert unter diesen Bedingungen quantitativ N,3,4-Trimethyl-o-phenylendiamin. Auf diese Weise lässt sich der Anteil an X in Gemischen quantitativ bestimmen. Es liess sich so erkennen, dass die Kupplung unter den üblichen Pufferbedingungen fast ausschliesslich X liefert, sogar beim Arbeiten in Eisessig ohne Pufferzusatz.

¹¹⁾ M. Tishler, K. Pfister, R. D. Bobson, K. Ladenburg & A. J. Fleming, J. Amer. chem. Soc. **69**, 1487 (1947).

¹²⁾ Präparat der Dr. Th. Schuchardt-GmbH., München.

¹³⁾ Vgl. P. Karrer & H. F. Meerwein, Helv. **19**, 269 (1936).

Die Frage des Auftretens von N-Kupplungsprodukten in der Vorstufe der Flavinsynthese ist bisher wenig verfolgt worden¹⁴). Eine Beimengung von X fällt im Farbton des tiefgefärbten Reaktionsprodukts IX nicht auf. X reagiert jedoch, wie wir feststellten, unter den Bedingungen der *Tishler*-Kondensation mit Barbitursäure schnell und quantitativ zum flavigelben 5-Arylazo-Derivat XI, das sich kaum vom gewünschten Flavin XII, welches aus IX mit Barbitursäure entsteht, abtrennen lässt. Es ist demnach möglich, dass in synthetischen Roh-Flavinen solche Substanzen als Verunreinigungen enthalten sind. Isolierte N-Kupplungsprodukte vom Typ X wurden bisher nicht weiter verarbeitet¹³). Uns gelang die Umlagerung $X \rightarrow IX$ nur in schlechter Ausbeute, wohl deswegen, weil solche Umlagerungen meist nur bei vielfachem Überschuss an passiver Komponente gut verlaufen. Beim Behandeln von X mit der äquivalenten Menge konz. HCl in warmer konz. Ameisensäure liess sich hingegen N,3,4-Trimethylanilin (V) in 50-proz. Ausbeute zurückgewinnen.

Ausschliessliche Kernkupplung erhielten wir beim Verarbeiten von V mit diazotierter p-Aminobenzoesäure in Ameisensäure bei verlängerter Reaktionsdauer. Hierbei wird die Fällung von intermediär gebildetem X durch möglichst hohe Säurekonzentration vermieden. Das so gewonnene IX schmilzt ohne Zersetzung und nimmt die berechnete Menge Wasserstoff auf. Der Anteil an 2-Azo-Derivat bleibt infolge sterischer Hinderung gering. Wir erhielten bei der nachfolgenden *Tishler*-Kondensation jeweils einen Rückstand von 10–15% nicht in Reaktion tretenden Farbstoffs IX, der aus reaktionsträgem 2-Azo-Derivat besteht¹⁵).

Ausgehend von IX gelangten wir durch Kondensation mit Barbitursäure, 2-Thiobarbitursäure¹⁶) bzw. Barbitursäure-2-imid¹⁷) zum Lumiflavin (XII)¹⁸), 2-Thiolumiflavin (XIII) bzw. 2-Lumiflavimin (XIV). Während jedoch Barbitursäure in Butanol-Essigsäure bei 120° in 6 Std. gut reagiert, darf bei der Reaktion mit Thiobarbitursäure höchstens 2 Std. mit Methanol-Essigsäure zum Rückfluss erwärmt werden. Das Imid hingegen reagiert auch in reiner Essigsäure bei Rückflusstemperatur in 20 Std. überhaupt nicht. Führt man jedoch IX zunächst mit trockener HCl ins Hydrochlorid über, so findet schnelle Reaktion statt unter weitgehender Zersetzung des Endproduktes: Neben wenig Flavimin XIV und verharztem Ausgangsmaterial wurden zwei Verbindungen $C_9H_9O_4N_3$ und $C_{11}H_{12-14}ON_2$ isoliert.

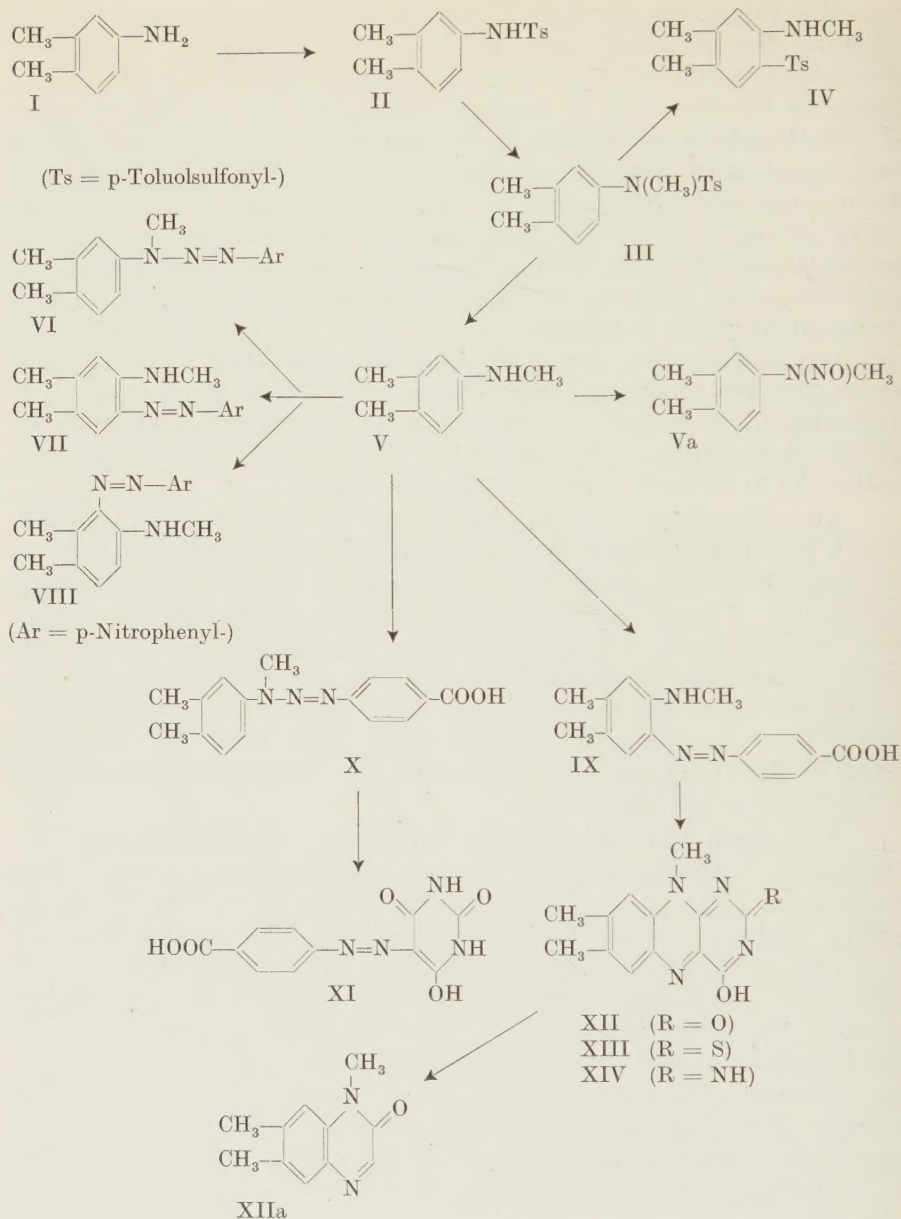
¹⁴) Die Rohfarbstoffe werden vielfach direkt weiterverarbeitet, vgl. z. B. D. Heyl, E. C. Chase, F. Koniuszy & K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3826 (1951).

¹⁵) Vgl. die Beobachtungen von *Tishler* et al.¹¹).

¹⁶) Präparat der *Fluka AG.*, St. Gallen.

¹⁷) Dargestellt analog Org. Synth. **32**, 45 (1952).

¹⁸) Vgl. Synthese des Lumiflavins auf anderem Wege durch R. Kuhn & K. Reine-mund, Ber. deutsch. chem. Ges. **67**, 1932 (1934).



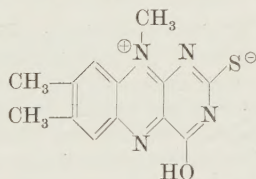
Die erhaltenen Flavine zeigten im Papierchromatogramm keine Beimengung der entsprechenden Isoflavine (z. B. Isolumiflavin = 5,6,9-Trimethylisoalloxazin). Als analytischen Test haben wir unser Lumiflavin-Präparat mit 2-n. NaOH zur 1,6,7-Trimethyl-2-chinoxälon-3-carbonsäure abgebaut und diese decarboxyliert: Wir erhielten

ein schmelzpunktrees 1,6,7-Trimethyl-2-chinoxalon, wie es beim Abbau von natürlichem Lumiflavin erhalten wird¹⁹⁾.

Das mit Thiobarbitursäure erhaltene, rotviolette 2-Thiolumiflavin (XIII) fluoresziert nicht. Es verliert bei Einwirkung schwacher Oxydationsmittel (z. B. verd. H_2O_2) bei längerem Stehen auch schon an der Luft den Schwefel unter Bildung des stark fluoreszierenden, gelbgrünen Lumiflavins. Spuren von Peroxyd (z. B. in Dioxan) lassen sich mit XIII in alkalischer Lösung nachweisen. Auch durch schwache Reduktionsmittel (z. B. Dithionit) wird XIII zu einer gelben Zwischenstufe²⁰⁾ entfärbt, aus welcher mit stärkeren Reduktionsmitteln (z. B. Zn in Essigsäure) ein farbloses Dihydro-Derivat entsteht. Beide werden an der Luft wieder zu XIII oxydiert. Im Papierchromatogramm zeigt XIII ebenfalls Luftoxydation; es entstehen zwei unscharf ineinander übergehende Flecke von XIII und einem weiteren Körper, wovon nur der letztere fluoresziert, welcher auch nach seinem Rf-Wert mit XII identisch ist.

Das mit Barbitursäureimid gewonnene, orangebraune 2-Lumiflavimin (XIV) fluoresziert resedagrün im pH-Bereich 4–8 und ist im Gegensatz zu allen andern bekannten Flavinen in 2-n.NaOH nicht gut löslich, sehr gut dagegen in 4-n.Mineralsäuren und organischen Säuren. Im Papierchromatogramm zeigt es einen geringen, aber deutlichen Rf-Unterschied gegen Lumiflavin. Es ist unempfindlich gegen schwache Oxydationsmittel und wird in saurem und in alkalischem Milieu mit Zn entfärbt. Das Reduktionsprodukt ist alkalilöslich und geht mit Luft über eine deutlich erkennbare, gelbliche, in konz. salzsaurem Milieu tiefrote²⁰⁾ Zwischenstufe wieder in das stark fluoreszierende XIV über. Von Perhydrol in 6-n. HCl wird XIV ebenso wie XII²¹⁾ nicht angegriffen. In Chloroform ist XIV im Gegensatz zu XII und XIII unlöslich.

Der Farbe nach ist bei XIII auf das Vorhandensein eines Thio-carbonyl-Chromophors zu schliessen. Andererseits übersteigt die chemische Stabilität der Verbindungen XIII und XIV bei weitem diejenige eines Thiochinons bzw. Chinonimins. Wir vermuten daher, dass diese Stoffe in Lösung weitgehend in polarer Form vorliegen, z. B.



¹⁹⁾ Zum alkalischen Lumiflavin-Abbau vgl. *W. S. McNutt Jr.*, *J. biol. Chemistry* **219**, 366 (1956).

²⁰⁾ Über den Verlauf der Flavinreduktion in zwei Ein-Elektronenstufen und die Ausbildung von semichinoiden Verbindungen („Rhodoflavin“) vgl. *R. Kuhn & R. Ströbele*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **70**, 753 (1937) sowie ²⁾.

²¹⁾ U.S. Pat. 2324800, *Chem. Abstr.* **38**, 221 (1944).

Über die Resultate der komplex-chemischen Untersuchung und der biologischen Prüfung wird später berichtet.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. unter 250° wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korr.

N-Tosyl-3,4-dimethylanilin (II). In eine Lösung von 80 g 3,4-Dimethylanilin (I) (0,67 Mol) in 200 cm³ abs. Pyridin werden 126 g (0,7 Mol) reines p-Toluolsulfochlorid portionsweise eingetragen. Die Mischung erwärmt sich unter Orangefärbung auf ca. 60°. Nach 30 Min. wird die klare Lösung 1 Std. auf dem Ölbad zum Sieden erhitzt. Man destilliert das überschüssige Pyridin soweit wie möglich am Vakuum ab und nimmt den sirupösen Rückstand mit 600 cm³ Wasser auf. Nach längerem kräftigem Schütteln kristallisiert das Tosylderivat II. Man filtriert, zerstösst die Kristallklumpen und wäscht mit viel Wasser. Das schwach gelbliche Rohprodukt vom Smp. 139–144° wird direkt weiterverarbeitet. Eine Probe gibt aus Alkohol farblose, hexaedrische Kristalle von Smp. 142,5–143,5°.

C₁₅H₁₇O₂NS Ber. N 5,08% Gef. N 5,08%

N,3,4-Trimethyl-N-tosylanilin (III). Das feuchte, rohe Tosylat II aus 80 g (0,67 Mol) 3,4-Dimethylanilin wird mit ca. 400 cm³ 2-n. NaOH (ca. 10-proz. Überschuss) angeteigt und die so erhaltene Suspension des in der Kälte schwerlöslichen Na-Salzes mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt. Man erwärmt langsam unter Rühren auf 60–70° und erhält eine klare bräunliche Lösung. Bei aufgesetztem Rückflusskühler wird nun so lange Methanol zugegeben, bis eine leichte Trübung nicht mehr verschwindet. Zur stark siedenden Lösung lässt man darauf 100 g (0,8 Mol) reinstes Dimethylsulfat langsam einfließen. Nach einiger Zeit beginnt sich das Tosylat III als Öl abzuscheiden. Nach ca. 1 Std. macht man mit der äquivalenten Menge 2-n. NaOH wieder alkalisch, versetzt nochmals mit 100 g Dimethylsulfat und lässt 2 Std. sieden. Danach wird gegen Phenolphthalein neutralisiert, zur Zerstörung unverbrauchten Dimethylsulfats mit einem geringen Überschuss 2-n. NaOH versetzt und bei ca. 300 mm das gesamte Methanol abdestilliert. Die noch heisse, ölige Suspension lässt man absitzen und dekantiert, bevor die Kristallisation unverbrauchten Na-Salzes von II einsetzt. Zur Entfernung der letzten Spuren Ausgangsmaterial behandelt man den öligen Rückstand zweimal mit kochendem Wasser; die wässrige Phase muss hierbei immer phenolphthalein-alkalisch gehalten werden. Das reine Tosylat III lässt sich darauf durch Schütteln mit Eiswasser kristallisieren. Das schwach alkalische Filtrat der Kristallisation darf mit konz. Salzsäure keine Fällung von II mehr ergeben. Das so als farblores Kristallpulver erhaltene III schmilzt nach mehrtägiger Trocknung im Exsikkator über Schwefelsäure bei 69–71°. Aus organischen Lösungsmitteln unregelmässige hexaedrische Kristalle vom Smp. 70,5–71°.

Der Smp.-Unterschied erlaubt eine gute Unterscheidung beider Tosylderivate, ihre Trennung auf Grund der verschiedenen Alkalilöslichkeit ist aber nur über 50° möglich.

C₁₆H₁₉O₂NS Ber. N 4,84% Gef. N 4,92%

Verseifung von III zu N,3,4-Trimethylanilin (V). a) Mit konz. Salzsäure: Die aus 80 g I erhaltene Menge III wurde im Sulfierkolben unter Rückfluss mit 500 cm³ konz. HCl unter starkem Rühren zum Sieden erhitzt. Nach 18 Std. ist das ölige Tosylat verschwunden, die Lösung ist klar und fast farblos. Die überschüssige Säure wird unter mehrmaligem Ersatz des verdampften Wassers am Vakuum abdestilliert. Dann wird vorsichtig 30-proz. NaOH bis zur Neutralität gegen Kongo zugegeben, wobei keine Fällung von IV (s. unter b) auftritt. Die Lösung wurde mit K₂CO₃ gesättigt, dampfdestilliert und wie üblich aufgearbeitet. Wir erhielten 74,5 g farblores N,3,4-Trimethylanilin (V) vom Sdp. 113–114,5°/13 mm. n = 1,558 bleibt über die ganze Destillation konstant, die Nitrosierung in 2-n. HCl bei 0° liefert quantitativ das Nitrosamin Va, welches in der Kälte isoliert werden kann. Spuren von Diazoniumsalz oder tertiärer Base sind im Filtrat nicht nachweisbar. Va kristallisiert bei –20° aus Methanol in farblosen Nadeln vom Smp. 32,5–33°.

C₉H₁₂ON₂ Ber. N 17,06% Gef. N 16,95%

Das Pikrat von V, aus pikrinsäurehaltigem Alkohol kristallisiert, zeigt den Smp. 133—136°.

$C_{15}H_{16}O_7N_4$ Ber. N 15,39% Gef. N 15,15%

b) Versuch mit konz. Schwefelsäure: N,3,4-Trimethyl-6-tosylanilin (IV). Zur Lösung von 5 g III in konz. H_2SO_4 wurde langsam Wasser zugegeben bis zur bleibenden Trübung. Nach 2stdg. Erwärmen auf 120° wurde in Eiswasser aufgenommen. Die ölige Suspension kristallisierte nach kurzem Schütteln. Das schwefelhaltige Kristallinat ergab nach Reinigung mit Tierkohle aus Alkohol in 30—40° Ausbeute des N,3,4-Trimethyl-6-tosylanilin IV in schönen Nadeln vom Smp. 144—145°.

$C_{16}H_{19}O_2NS$ Ber. C 66,40 H 6,62 S 11,08%
Gef. „ 66,46 „ 6,45 „ 11,07%

Die Verbindung ist unlöslich in 2-n. Mineralsäuren, löslich in 6-n. Mineralsäuren, und bildet mit HNO_2 ein auch in konz. Säuren fast unlösliches Nitrosoderivat.

Aus der Mutterlauge von IV lassen sich durch Neutralisation, Aussalzen mit K_2CO_3 und Dampfdestillation 20—30% des gewünschten Amins V (s. unter a) isolieren.

N,3,4-Trimethyl-6-(p-carboxyphenylazo)-anilin (IX). Aus 13 g (0,09 Mol) reiner p-Aminobenzoesäure stellt man durch Lösen in einer warmen Mischung von 25 cm³ konz. HCl und 60 cm³ Wasser und anschliessendem kräftigen Schütteln in Kältemischung eine feine Suspension des Hydrochlorids her. Dazu gibt man unter Schütteln durch einen Trichter mit langem Ansatz unter die Flüssigkeitsoberfläche langsam eine Lösung von 10 g Natriumnitrit in 20 cm³ Eiswasser, wobei die Temperatur unter 5° gehalten wird. Das Hydrochlorid löst sich zunächst, dann fällt jedoch sofort das voluminöse Diazoniumsalz aus. Nach kurzem Stehen bei 0° gibt man zur Entfernung überschüssigen Nitrits 10 g Harnstoff zu, lässt ca. ½ Std. unter gelegentlichem Schütteln stehen und giesst die Suspension in die mechanisch gerührte, auf -10° vorgekühlte Lösung von 13,5 g (0,1 Mol) V in 250 cm³ 85-proz. Ameisensäure. Die Farbstoffbildung setzt sofort ein, es tritt jedoch zunächst keine Fällung auf. Man rührt 1 Std. bei -10°, dann 2 Std. bei 0° und lässt unter dauerndem Rühren über Nacht auf Zimmertemperatur kommen, wobei sich der weitaus grösste Teil des Farbstoffes als schwarzviolett, glitzerndes Hydrochlorid abscheidet. Man kühlt auf -15° und filtriert durch eine Glasfilternutsche; Ausbeute 19 g. Aus der Mutterlauge lassen sich durch Verdünnen mit dem gleichen Volumen Wasser weitere 2 g sehr unreinen Farbstoffs fällen. Zum Filtrat gibt man 70 cm³ (ca. 0,5 Mol) 30-proz. NaOH zur Neutralisierung der Mineralsäure und destilliert die Ameisensäure soweit möglich am Vakuum ab. Den Rückstand nimmt man in Wasser auf und entfärbt mit viel Kohle. 3,5 g unverbrauchtes V lassen sich dann durch Behandeln mit Pottasche und Dampfdestillation zurückgewinnen.

Die Hauptfraktion des Farbstoffs wird aus 1-n. NaOH mit 2-n. Essigsäure umgefällt und im Vakuum mehrere Tage über H_2SO_4 getrocknet. Durch 24stündige Extraktion des so erhaltenen karminroten Produktes im Soxhlet mit abs. Benzol erhält man 9 g Farbstoff. Den harzigen Extraktionsrückstand fällt man nochmals um unter Zugabe von einigen g Celit, filtriert, trocknet und erhält durch Extraktion mit Benzol nochmals 3,4 g Farbstoff. Gesamtausbeute 59% bezogen auf verbrauchtes V; Smp. 208—214°. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet, da es mit Raney-Nickel in Alkohol bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck fast die berechnete Menge Wasserstoff aufnimmt. Zur Analyse wurde aus Toluol umkristallisiert. Smp. 213,5—215°.

$C_{16}H_{17}O_2N_3$ Ber. N 14,83% Gef. N 14,79%

Aus organischen Lösungsmitteln kristallisiert IX in dicken karminroten Spiessen, die bei ca. 185° zu sublimieren beginnen. Eine spontane Zersetzung wie bei X ist dagegen nicht festzustellen. Aus wässriger Lösung helle, rotorange Mikrokristalle, die sich bei 170° zu feinen Nadeln zusammenlagern und ab ca. 190° die karminrote Farbe der aus organischen Mitteln kristallisierten Proben annehmen. Man kann IX mit Dithionit in essigsaurer Lösung reduzieren. In alkalischer Lösung ist der Farbstoff gegen Dithionit ziemlich beständig.

Der unscharfe Smp. des Rohproduktes ist vermutlich auf Beimengung von 2-Azo-derivat zurückzuführen.

N-(p-Carboxyphenylazo)-N,3,4-trimethylanilin (X). Man bereitet die Diazoniumsalzsuspension wie für IX, verdünnt dann aber solange mit Eiswasser, bis sich alles Diazoniumsalz gelöst hat und kuppelt wie üblich in Acetatpuffer. Das N-Kupplungsprodukt X fällt sofort aus. Nach kurzem Digerieren lässt man langsam auf 20° kommen und filtriert. Der hellorange gelbe Farbstoff löst sich in konz. Säuren mit hellvioletter Farbe; er lässt sich am besten aus heissem verdünntem Ammoniumhydroxyd oder aus siedendem Butanol kristallisieren. Die freie Säure schmilzt unter Aufschäumen bei 190 bis 191°.

Die Verbindung X lässt sich mit *Raney*-Nickel bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck nicht hydrieren¹³⁾.

$C_{16}H_{17}O_2N_3$ Ber. N 14,83% Gef. N 14,85%

Kupplung mit p-Nitranilin als Diazo-Komponente. Die Kupplung des Amins V analog einer Vorschrift von *Tishler* et al.¹⁴⁾ ergab nach Vertreibung der Essigsäure, Neutralisation mit K_2CO_3 und Aufnahme in Äther ein tiefvioletteres, zähes, nicht kristallisierendes Öl. Eine Probe wurde mit viel Petroläther extrahiert und über aktiviertem Aluminiumoxyd chromatographiert. Wir erhielten zwei violette und eine karminrote Schicht, die sich schon mit Petroläther-Benzol (1:1) langsam eluieren liessen.

Aus den violetten Schichten wurde der Hauptanteil, schwarzviolette Nadeln vom Smp. 176—177,5°, vermutlich N,3,4-Trimethyl-6-(p-nitrophenylazo)-anilin (VII), analysenrein erhalten.

$C_{15}H_{16}O_2N_4$ Ber. C 63,36 H 5,67 N 19,71%
Gef. „ 63,36 „ 5,55 „ 19,94%

Die zweite violette Fraktion betrug ca. 10% der ersten und ergab wenige mg rotvioletter Nadeln vom Roh-Smp. 139—141°, vermutlich das 2-Azo-Derivat VIII.

Die dritte, stärkste Fraktion — aus der karminroten Schicht — bestand aus Kristallen von zwei Formen, jedoch vom gleichen Smp. 99—101°: Feine, faserige, gelborange Nadeln und unregelmässige, grobe, rostbraune Rhomboeder. Diese Dimorphie ist bekannt für das homologe N-(p-Nitrophenylazo)-p-toluidin²²⁾, so dass dem vorliegenden Kristallisat wohl die Struktur des Diazoaminokörpers VI zukommt.

$C_{16}H_{16}O_2N_4$ Ber. N 19,71 Gef. N 19,77%

5-(p-Carboxyphenylazo)-barbitursäure (XI). 1,5 g Diazoaminoverbindung X (0,0053 Mol) und 1,0 g reine Barbitursäure (0,0061 Mol) werden mit 6 cm³ Eisessig und 20 cm³ n-Butanol 4 Std. auf dem Ölbad unter Rühren am Rückflusskühler erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der nicht fluoreszierende, gelbe Rückstand abgesaugt, aus 2-n. NaOH umgefällt und mehrere Male aus heissem verd. Ammoniumhydroxyd umkristallisiert. Ockergelbe Stäbchen. Die potentiometrische Titration mit 0,01-n. HCl deutet auf das neutrale Salz einer zweibasischen, organischen Säure vom Mol.-Gew. ca. 350 (ber. 310). Die schwerlösliche freie Säure XI wurde zur Analyse aus der Lösung des Ammoniumsalzes durch verd. Essigsäure gefällt. Sie bleibt bis 360° unzersetzt.

$C_{11}H_8O_5N_4$ Ber. C 47,83 H 2,92 N 20,29%
Gef. „ 47,41 „ 2,85 „ 20,56%

XI lässt sich mit Zink in heissem Eisessig irreversibel zu einer farblosen Verbindung reduzieren.

Lumiflavin (6,7,9-Trimethylisalloxazin) (XII). Eine Suspension von 3,0 g Azofarbstoff IX und 2,0 g Barbitursäure in 10 cm³ Eisessig und 30 cm³ n-Butanol wurde 5 Std. unter Rückfluss kochend gerührt¹³⁾. Aus der entstandenen bordeauxroten Lösung scheiden sich nach 1 Std. die ersten gelben, grün fluoreszierenden Kristalle ab. Nach 4 Std. ist kaum noch eine Rotfärbung zu erkennen. Man versetzt die gelborange Suspension zur Vervollständigung der Flavinabscheidung mit einem gleichen Volumen

²²⁾ H. Mehner, J. prakt. Chem. **65**, 449 (1902).

abs. Isopropyläther und erhält so 2,4 g (88%) rohes Flavin, welches durch Umfällen aus 2-n. NaOH mit 2-n. Essigsäure gereinigt wird (2,2 g). Zur Analyse wurde aus konz. Ameisensäure umkristallisiert¹⁸). Die langen, strohgelben Nadeln enthalten nach der Trocknung bei 20°/0,01 mm noch $\frac{1}{2}$ Mol Säure¹⁸) und sind nach 5 Std. bei 130°/0,01 mm analysenrein, Smp. (Zers.) 322° (Lit.²⁰) 322°).

$C_{13}H_{12}O_2N_4$ Ber. N 21,87% Gef. N 21,74%

Aus der Mutterlauge lassen sich durch Abdampfen, Aufnahme in 2-n. NaOH und Fällung mit 2-n. Essigsäure 0,3 g sehr unreinen Azofarbstoffs zurückgewinnen¹³).

Beim alkalischen Abbau und nachfolgender Decarboxylierung der entstandenen Chinoxalonearbonsäure wird 1,6,7-Trimethyl-2-chinoxalon vom Smp. 174—176° erhalten, Lit. Smp. 176°¹⁹).

2-Thiolumiflavin (XIII). Die tiefrote Suspension von 1,9 g IX (0,0067 Mol) und 1,4 g 2-Thiobarbitursäure (0,0097 Mol)¹⁶) in 15 cm³ Eisessig und 50 cm³ abs. Methanol wurde auf dem Wasserbad zum Rückfluss erwärmt. Der Verlauf der Reaktion lässt sich durch Entnahme von Proben verfolgen, welche man mit 1-n. NaOH und einem Tropfen Perhydrol versetzt. IX wird von alkalischem Peroxyd nicht angegriffen, während das ebenfalls tiefrote XIII sofort unter Farbumschlag über schwarzgrün nach gelb reagiert. Nach 3 Std. zeigt die Peroxydprobe nur noch eine schwache Rotfärbung. Nach 4 Std. wurde die Reaktion abgebrochen und das Gemisch über Nacht bei -15° stehengelassen. Die glänzenden, dunkelvioletten Kristalle wurden mit Methanol und dann mit Äther gut gewaschen. Ausbeute 1,5 g (82,5%). Zur Reinigung nimmt man in 3 Teilen konz. HCOOH auf, filtriert, fügt zum Filtrat 1 Teil abs. Butanol und erwärmt auf ca. 60°. Man versetzt die warme Lösung mit abs. Isopropyläther, bis die auftretende Fällung sich nicht mehr löst, filtriert schnell durch einen Faltenfilter und lässt bei 0° kristallisieren: Unregelmässige, rhomboedr., schwarzrote, dicke Kristalle; Sintern bei ca. 266°, Zers. ca. 310°. Das so erhaltene Produkt behält analog zum Lumiflavin nach 12 Std. Trocknung bei 20°/0,01 mm noch $\frac{1}{2}$ Mol Ameisensäure:

$C_{13}H_{12}ON_4S$, $\frac{1}{2}$ HCOOH Ber. C 54,85 H 4,44% Gef. C 54,84, 54,61 H 4,37, 4,45%

Nach 5stündiger Trocknung bei 110°/0,01 mm

$C_{13}H_{12}ON_4S$ Ber. C 57,33 H 4,44 S 11,77% Gef. C 57,10 H 4,12 S 11,45%

Aus der Mutterlauge lassen sich durch Eindampfen, Behandlung mit 2-n. NaOH, Fällung mit verd. Essigsäure und Extraktion mit Benzol 0,2—0,3 g ziemlich unreines IX zurückgewinnen.

2-Thiolumiflavin ist leicht löslich in verd. NaOH mit rotvioletter Farbe und in konz. Säuren, wenig löslich in Wasser und Alkohol (dunkelorange), unlöslich in Äther. Beim Verdünnen stark essigsaurer Lösungen mit Wasser entstehen übersättigte Lösungen, die erst nach Tagen ausflocken.

2-Lumiflavimin (XIV). Die Suspension von 3 g Azofarbstoff IX (0,011 Mol) und 2 g Barbitursäure-2-imid (0,016 Mol)¹⁷) in 70 cm³ Essigsäure wurde mit trockenem HCl gesättigt. Danach wurde 1 $\frac{1}{2}$ Std. auf dem Dampfbad unter dauerndem Rühren erwärmt. Das schwarzviolette Farbstoffhydrochlorid ging hierbei zum Teil in Lösung, jedoch ohne Farbänderung. Daraufhin erwärmte man 3 Std. im Ölbad zum Rückfluss bis zur fast vollkommenen Aufhellung. Nach dem Abkühlen wurde filtriert und mit Eisessig gewaschen (Filtrat A; Aufarbeitung siehe unten).

Verbindung $C_9H_9O_4N_3$. Der graubraune Rückstand (ca. 1,1 g), wenig löslich in konz. Ameisensäure, sehr wenig löslich in Wasser, gut löslich in verd. NaOH und konz. Mineralsäuren, wurde in 1-n. NaOH gelöst, mit Kohle entfärbt und mit 800 cm³ siedender 0,5-n. Essigsäure gefällt. Nach Filtration von der ersten spontanen Fällung durch einen Heisswassertrichter liess man über Nacht bei 2° kristallisieren: Ca. 0,3 g lange, sehr voluminöse, faserige, zu Sternen geordnete Nadeln, die nochmals aus viel heissem Wasser kristallisiert wurden.

$C_9H_9O_4N_3$ Ber. C 48,45 H 4,03 N 18,82%
Gef. „ 48,49; 48,63 „ 3,80; 4,23 „ 18,78; 18,66%

Die Verbindung wird beim Trocknen (20°/0,01 mm) schwach gelblich und bleibt bis 360° unverändert. Bei Behandlung mit HNO_2 und sodann mit verd. NH_4OH entsteht kein Farbsalz, so dass sicher kein Pyrimidin mit freier 5-Stellung vorliegt.



Fig. 1.

Laufmittel: Ameisensäure/n-Butanol/Wasser 10:77:13 nach Karrer et al.²³⁾. Laufzeit: 16 Std. Papier: Whatman Nr. 1. Temperatur: 20°.

Die gefärbten Flecke sind mit durchgezogenen, die im UV.-Licht fluoreszierenden Flecke mit gestrichelten Kurven umrandet.

1. Kontrolle mit Lumiflavin: Hellgelbe Farbe, gelbgrüne Fluoreszenz. $R_f = 0,33$.

2. 2-Thiolumiflavin (XIII): I rotviolett, II Übergang von rotviolett nach gelbgrün, III gelbgrün. Der Übergang ist kontinuierlich. II + III zeigen gelbgrüne Fluoreszenz.

$R_f(I + II) = 0,36$ (Thiolumiflavin).

$R_f(II + III) = 0,33$ (Endprodukt der Luftoxydation = Lumiflavin).

3. 2-Thiolumiflavin nach Behandlung mit alkal. Peroxyd: Der langsam wandernde Anteil ist gelbgrün und fluoresziert gelbgrün; $R_f = 0,33$ (Lumiflavin). Der schnell wandernde Anteil ist farblos und fluoresziert blauweiss (Zersetzungsprodukt, vermutlich ein Chinoxalin)²⁴⁾.

4. Lumiflavinin (XIV): Farbe dunkelgelb, Fluoreszenz resedagrün. $R_f = 0,38$.

Die R_f -Werte sind mit einem Fehler von $\pm 0,01$ reproduzierbar.

----- Lösungsmittelfront

○ Startpunkte

²³⁾ W. Forter & P. Karrer, Helv. **36**, 1530 (1953).

²⁴⁾ Über blauweisse Chinoxalin-Fluoreszenz vgl. ¹⁹⁾.

Verbindung $C_{11}H_{12-14}ON_2$. Das Filtrat A wurde am Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Wasser versetzt, es entsteht eine klare gelbbraune Lösung, die alkalisch gemacht, mehrmals ausgeäthert und dann mit 2-n. Essigsäure neutralisiert wurde. Den entstandenen Niederschlag (B) liess man über Nacht bei 0° absitzen.

Der Ätherextrakt enthielt 0.5 g eines stark basischen Öls, welches sich leicht in verd. Mineralsäuren löst und bei Neutralisation wieder ausfällt. Die Substanz ist nicht acylierbar, nicht nitrosierbar, dunkelt schnell an der Luft, vor allem bei Gegenwart von Säure oder Alkali, und liefert ein schön kristallines Pikrat von grosser thermischer Stabilität: Ab 235° langsame Abspaltung von Pikrinsäure, Bräunung und Zersetzung bei 368°. Zur Analyse wurde mehrmals aus pikrinsäurehaltigem Alkohol umkristallisiert.

$C_{11}H_{12}ON_2$, $C_6H_3O_7N_3$	Ber. C 48,92	H 3,62	N 16,78%
	Gef. „ 48,50; 48,55	„ 3,86; 3,63	„ 16,69; 16,99%

Die Zerlegung von 200 mg des Pikrates mit Alkali ergibt wieder 90 mg basisches Öl, welches bei der Trocknung (50°/0.1 mm) kristallisiert und ab ca. 100°/0.01 mm sublimiert zu farblosen rhomboedr. Kristallen, die von 140—170° schmelzen. Der Vergleich der Pikrate und der freien Basen zeigte, dass die vorliegende Substanz nicht mit dem Flavin-Abbauprodukt 1.6,7-Trimethyl-2-chinoxalon identisch ist, auf welches die Summenformel zutreffen könnte.

2-Lumiflavinin (XIV). Die Fällung B wurde nach dem Absaugen noch feucht in überschüssiger 1-n. NaOH aufgenommen, einige Zeit geschüttelt und filtriert. Nach dem Neutralwaschen und Trocknen des schwer filtrierbaren Rückstandes blieben ca. 0.2 g einer braunen Fraktion, welcher die eigentliche Fluoreszenz zugeschrieben werden muss. Aus dem nur schwach fluoreszierenden Filtrat konnte noch eine geringe Menge der Verbindung $C_9H_9O_4N_3$ gewonnen werden.

Die alkaliunlösliche Flavinfraction wurde dreimal durch Umlösen aus Ameisensäure-Butanol-Isopropyläther gereinigt (vgl. Verb. XIII). Es blieben ca. 50 mg gelbbraune, sechseckige Blättchen, in Lösung hellgelb mit sehr intensiver resedagrüner Fluoreszenz im pH-Bereich 4—8, wenig löslich in Wasser und Alkalien, gut löslich in verd. Mineralsäuren und konz. organischen Säuren. Die Kristalle enthalten nach Trocknung bei 20°/0.01 mm ca. 1.5 Mol Ameisensäure. Verfärbung bei 150° ($HCOOH$ entweicht), Zersetzung ab 330°. Auch nach 5 Std. bei 110°/0.01 mm behält die Verbindung 1 Mol $HCOOH$:

$C_{13}H_{13}ON_5$, CH_2O_2	Ber. C 55,80	H 5,02	N 23,25%
	Gef. „ 55,00	„ 4,86	„ 23,02%

XIV unterscheidet sich in Fluoreszenz und Farbe deutlich vom Lumiflavin. Durch Zink und Essigsäure wird die Verbindung entfärbt. Das Reduktionsprodukt ist alkalilöslich und nicht fluoreszent und wird bei geringstem Luftzutritt wieder dehydriert.

Zur weiteren Charakterisierung der Flavine XIII und XIV wurden die Rf-Werte im Papierchromatogramm festgestellt (vgl. Fig. 1). Die Substanzen sind chromatographisch rein.

Herrn Dr. B. Prijs sei auch an dieser Stelle für Rat und Interesse an der vorliegenden Arbeit herzlich gedankt.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft Basel (Dr. H. Gysel).

SUMMARY.

A short way for the synthesis of lumiflavin and derivatives is developed, leading to the new structural analogues 2-thiolumiflavine and 2-lumiflavimine, which exhibit interesting oxido-reductive and metal chelating properties and may be riboflavin antimetabolites.

Curriculum vitae

Ich, *Peter Erwin Leonhard Hemmerich*, aus Frankfurt am Main, wurde am 30. Dezember 1929 als Sohn des Kaufmanns Franz Hemmerich und seiner Gattin Erna, geb. Haurand, daselbst geboren.

Ich besuchte ab 1936 die drei ersten Vorschulklassen und trat im Frühjahr 1939 in das humanistische Lessing-Gymnasium zu Frankfurt am Main ein. Im Frühjahr 1944 absolvierte ich das letzte Halbjahr der 5. Gymnasialklasse am humanistischen Landschulheim Birklehof zu Hinterzarten (Schwarzwald). Nach anderthalbjähriger Unterbrechung der Ausbildung infolge der Kriegsereignisse trat ich im Januar 1946 in die Obersekunda des wiedereröffneten Landschulheims Birklehof ein, und bestand im Sommer 1948 das damals für die französisch besetzte Zone Deutschlands eingeführte Zentralabitur zu Freiburg i. Br.

Im Wintersemester 1948/49 immatrikulierte ich mich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. Da ich infolge des kriegsbedingten Mangels an Laborplätzen kein chemisches Praktikum belegen konnte, besuchte ich hauptsächlich mathematische Vorlesungen und wechselte nach zwei Semestern, im November 1949, zur Universität Basel über. Dort absolvierte ich nach Beendigung des anorganisch-chemischen Praktikums das Vorexamen in anorganischer Chemie bei Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer im November 1951. Im April 1952 legte ich bei Herrn Prof. Dr. W. Kuhn das Nebenfachexamen in physikalischer Chemie ab. Während drei Semestern besuchte ich das unter Leitung von Herrn Prof. Dr. T. Reichstein stehende organisch-chemische Praktikum, bestand im Januar 1954 das Vorexamen in organischer Chemie und im März – nach Besuch des Färbereipraktikums – das Vorexamen in Farbenchemie bei Herrn Prof. Dr. R. Wizinger. Im Mai 1955 absolvierte ich das Nebenfachexamen in Physik bei Herrn Prof. Dr. P. Huber und im März 1956 das dritte Nebenfachexamen in Mathematik bei Herrn Prof. Dr. A. Speiser.

Die vorliegende Dissertation begann ich im Juni 1954 unter Leitung von Prof. Dr. H. Erlenmeyer und beendete sie im Dezember 1956.

Im Verlaufe meiner Studien besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren und Dozenten:

In Freiburg: G. Bol, O. Gentner, W. Görtler, H. Staudinger, R. Süss.

In Basel: H. Dahn, H. Erlenmeyer, M. Fierz, C. A. Grob, F. Grün, W. Kuhn, H. Kuhn, E. Miescher, A. Ostrowski, T. Reichstein, E. Schlittler, E. Sorkin, A. Speiser, C. Tammi, R. Wizinger, und H. Zickendraht.

Allen diesen Herren danke ich für ihre Bemühungen. Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer, für sein mir stets entgegengebrachtes Wohlwollen und seine wertvollen Ratschläge aussprechen. Den Herren P. D. Dr. S. Fallab und Dr. B. Prijs danke ich für ihr Interesse an der vorliegenden Arbeit.

